

小腸粘膜ペプチダーゼ消化耐性を持つ
ACE 阻害ジペプチドの定量分析関 英治*・蔵島克裕*・松藤 寛**、
松井利郎**・蔵島 豊**Quantitative Analysis of Digestion Resistant
ACE Inhibitory Dipeptides by Small
Intestinal MucosaEiji Seki*, Katsuhiko Osajima*, Hiroshi Matsufuji**,
Toshiro Matsui** and Yutaka Osajima*** Research Laboratories, Senmi Ekisu Co., 779-2
Noda, Hirano-cho, Ozu-shi 795** Department of Food Science and Technology, Faculty
of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1
Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi 812

The short chain peptides derived from sardines were incubated for 120 min with an extract of porcine small intestinal mucosa. Digestion-resistant dipeptides found in the digest, Val-Tyr, Val-Trp, Ile-Tyr and Ile-Trp, inhibited angiotensin I converting enzyme (ACE). Amounts of the four dipeptides isolated from the digest using a Sep-pak C-18 cartridge column and three steps of high-performance liquid chromatography, were 85.88, 21.87, 10.69 and 6.51 mg/100 g peptides, respectively, and the contribution of four peptides to total ACE inhibitory activity was 10.5%. It was confirmed that ACE inhibitory dipeptides were present in the digest of the short chain peptides.

(Received Nov. 9, 1995)

食品タンパク質の消化物には、見かけ上のアンジオテンシンⅡ変換酵素 (EC 3.4.15.1: ACE) 阻害活性を示すものが存在し、食品ペプチドの ACE 阻害活性と高血圧ラット (SHR) への経口投与の際の降圧作用は必ずしも相関しない。これまでの研究で、イワシ筋肉のアルカリプロテアーゼ消化物中に、多くの ACE 阻害活性をもつペプチドが生成することがわかっている。その短鎖ペプチドの多くは消化酵素により分解を受ける¹⁾が、消化耐

性を持つ活性ペプチドが存在する。著者らは、消化吸収に関与する小腸粘膜のペプチダーゼの基質特異性から、活性ペプチドの一次構造が活性発現に重要であることを示唆した。中でも N 末に Val および Ile をもつジペプチドに消化耐性があること、また、Val-Tyr 構造がオリゴペプチドの C 末側に存在するとき、アミノペプチダーゼの作用は、Val-Tyr の手前で急激に低下することを示した²⁾。本報では、食品ペプチドの ACE 阻害活性の「体内における実効性」を評価する上で、食品ペプチドの小腸粘膜ペプチダーゼによる消化耐性は重要な因子であると考え、イワシ由来短鎖ペプチドの調製時、アルカリプロテアーゼにより生成した消化耐性な ACE 阻害ペプチドと、さらに小腸粘膜ペプチダーゼによりイワシ由来短鎖ペプチド中のオリゴペプチドから派生する ACE 阻害ペプチドの定量分析を行った。

イワシ由来短鎖ペプチドは、既報³⁾に従い、加熱処理したイワシタンパク質をアルカリプロテアーゼによって分解し調製した。イワシ由来短鎖ペプチドの消化は、Kim⁴⁾の方法により得た小腸粘膜ペプチダーゼを用いて行った。8 μmol 相当量のイワシ由来短鎖ペプチド (平均分子量 311) を 0.05 M KCl-ホウ酸緩衝液 (pH 7.5) 0.2 ml に溶解し、10 U に相当する粗酵素液 0.2 ml (Gly-Leu を基質とし、分解初速度 1 μmol/h/mg protein を 1 U とする) とともに、37 °C で 120 分間反応させた。反応後、2 M HCl 0.5 ml を加え、遠心分離後、上清を 2 M NaOH で中和した。消化後のイワシ由来短鎖ペプチドの平均鎖長は 1.59 であり、アミノ酸分析システム (LC-5 A、島津製作所製) を用いて求めた遊離アミノ酸量は 43.1% であった。小腸粘膜ペプチダーゼには、オリゴペプチドに作用するアミノペプチダーゼおよび、トリ・ジペプチダーゼが含まれており、トリペプチド以上のオリゴペプチドの場合、配列の N 末側から順次速やかに分解されること⁵⁾、また、ジペプチドの消化には、N 末側のアミノ酸の種類が影響する⁶⁾ことから、食品ペプチドの小腸粘膜ペプチダーゼ消化による ACE 阻害活性の残存には、ACE 阻害活性を持つ最小単位のジペプチドの N 末側のアミノ酸が重要な因子になると考えた。そこで、C 末に Tyr をもつ 16 種の合成ジペプチドの分解初速度⁷⁾とイワシ短鎖ペプチド中の各アミノ酸残基の遊離率との関係を図 1 に示した。Asp, Glu, Ile および Val を配列するペプチドの遊離アミノ酸比率は少なく、難消化性ジペプチドの存在が示唆された。さらに消化物

* 仙味エキス株式会社開発部 (〒795 愛媛県大洲市平野町野田 779 番地 2)

** 九州大学農学部食糧化学工学科 (〒812 福岡県福岡市東区箱崎 6 丁目 10 番 1 号)

中からの高活性なACE阻害ジペプチドVal-Trp, Ile-Tyr, Ile-TrpおよびVal-Tyrの定量を行った。消化物中の活性ジペプチドは、合成ペプチドを各々クロマトグラフィーにかけ、その溶出時間に対応して分取し、単

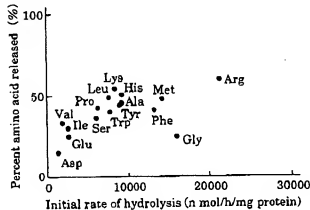


Fig. 1 Relationship between the initial rate of hydrolysis of dipeptides having Tyr at the COOH-terminus and percent amino acid released on the digestion of the short chain peptides by porcine intestinal mucosa aminopeptidases

The initial rate of hydrolysis of dipeptides, expressed as n moles of substrate hydrolyzed per hour per mg of protein at 37°C, were quoted from ref. 2.

Digestion was performed for 120 min.

離した。イワシ由来短鎖ペプチド20 mg量になる消化物のSep pak C-18カートリッジカラム (Waters社製) によるエタノール濃度のグラジエント溶出を行い、10% エタノール溶出画分 (Val-TyrおよびIle-Tyrの溶出)、10% と25% エタノール溶出画分を含ませた画分 (Val-TrpおよびIle-Trpの溶出) をAsahipak GS-320カラム (0.76 cm×30 cm, 旭化成工業製) を用いた高速液体クロマトグラフ (LC-6 A, 島津製作所製) に負荷し、50 mM 酢酸アンモニウム (pH 6.7)/アセトニトリル (80/20) で溶出した。分取した各ペプチド画分は、20 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.0) で再クロマトを行った後、YMC-pack ODS AQ-312 (0.60 cm×15 cm, YMC製) に供した。0.1% トリフルオロ酢酸中アセトニトリル 0.25%~25% (60分) のリニアグラジエントで溶出を行い、波長220 nmでモニタリングした。合成ペプチドVal-Tyr, Ile-Tyr, Val-TrpおよびIle-Trpの溶出時間21.82, 27.05, 38.55および44.66 minに対応した時間に単一のピークが認められ、アミノ酸分析の結果、各ジペプチドであることが判明した (Table 1)。消化によりVal-Tyr量は増加したが、他のジペプチドはほとんど変化しなかった。イワシ由来短鎖ペプチドの小腸粘膜ペプチダーゼ消化物に合成ペプチド1 nmolを添加した実験での回収率は、Val-TyrおよびIle-Tyrが90%、Val-TrpおよびIle-Trpが89%であった。単離したペプチドの IC_{50} 値と分解初速度²⁾が合成ペプチドのそれと

Table 1 The amount of the ACE inhibitory peptides in the short chain peptides before and after mucosa aminopeptidases digestion^a

Inhibitor	Amino acid content n mol (ratio) in hydrolyzate of dipeptide isolated from ODS column				Amount in the short chain peptides (mg/100g)
	Val	Ile	Tyr	Trp ^b	
Before digestion					
Val-Tyr	1.503 (1)		1.535 (1.02)		51.95
Val-Trp	0.580 (1)			0.655 (1.12)	21.17
Ile-Tyr		0.273 (1)	0.295 (1.08)		9.70
Ile-Trp		0.161 (1)		0.196 (1.22)	6.12
After digestion					
Val-Tyr	2.453 (1)		2.569 (1.05)		85.88
Val-Trp	0.598 (1)			0.678 (1.14)	21.87
Ile-Tyr		0.302 (1)	0.324 (1.07)		10.69
Ile-Trp		0.172 (1)		0.208 (1.21)	6.51

^a Digestion was performed for 120 min.

^b Tryptophan was determined by the glyoxylic acid method.

同等であったことより、各々のペプチドが該当の配列を有し、また、それがL-体であることを支持した。これらのペプチドは、それぞれ異なる起源の酵素分解物から単離され、Val-Tyrは人乳カゼイン⁹、ニンニク⁴および清酒¹¹から、Val-Trpは落柏¹¹から、Ile-Tyrは麴⁹およびイワシ¹⁰から得られていた。Ile-Trpについては、CHEUNGら¹¹により合成され、 IC_{50} 値 $2.0\mu M$ と報告されていた。本報により、初めて天然物から単離され、 IC_{50} 値 $1.2\mu M$ が得られ、これまでに報告されているACE阻害ペプチドの中で高い値であった。また、消化耐性(分解初速度 $3770\text{ nmol/h/mg protein}$)にも優れていた。消化前後のイワシ由来短鎖ペプチド(消化前: IC_{50} 値 $0.083\text{ mg protein/ml}$ 、消化後: IC_{50} 値 $0.071\text{ mg protein/ml}$)の全ACE阻害活性に占めるIle-Trpの寄与率(イワシ由来短鎖ペプチド量、その IC_{50} 値で除した値に対する、イワシ由来短鎖ペプチド中に含有するIle-Trp量をその IC_{50} 値で除した値の相対比と定義する。)は、それぞれ、1.3%、1.4%であった。単離した4つのジペプチド(IC_{50} 値: Val-Tyr: $11\mu M$, Ile-Tyr: $1.9\mu M$, Val-Trp: $1.1\mu M$, Ile-Trp: $1.2\mu M$)を合わせた消化後の全阻害活性に対する寄与率は、上記の算定法により、10.5%と見積もられ、イワシ由来短鎖ペプチドの小腸粘膜ペプチダーゼ消化物中に高活性なジペプチドが存在し、ACE阻害に寄与していることが明らかになった。

文 献

- 1) 関 英治・蔵島克裕・松藤 寛・松井利郎・成島 豊: 農化, 70, 21 (1996).
- 2) 関 英治・蔵島克裕・松藤 寛・松井利郎・成島 豊: 農化, 69, 1013 (1995).
- 3) MASTUI, T., MATSUFUJI, H., SEKI, E., OSAJIMA, K., NAKASHIMA, M. and OSAJIMA, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 922 (1993).
- 4) KIM, Y., KIM, Y.W. and SLEISENGER, M.H.: *Biochim. Biophys. Acta*, 370, 283 (1974).
- 5) 吉川正明・千葉英雄: 食品工業, 33, 20 (1990).
- 6) SUETSUNA, K., CHEN, J.R. and YAMAUCHI, F.: *Clin. Rep.*, 25, 79 (1991).
- 7) 斎藤義幸・中村圭子・川戸章嗣・今安 聡: 農化, 66, 1081 (1992).
- 8) SAITO, Y., WANEZAKI, K., KAWAMOTO, A. and IMAYASU, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1767 (1994).
- 9) YOKOYAMA, K., CHIBA, H. and YOSHIKAWA, M.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1541 (1992).
- 10) MATSUFUJI, H., MATSUI, T., SEKI, E., OSAJIMA, K., NAKASHIMA, M. and OSAJIMA, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 2244 (1994).
- 11) CHEUNG, H.S., WANG, F.L., ONDETTI, M.A., SABO, E.F. and CUSHMAN, D.M.: *J. Biol. Chem.*, 255, 401 (1980).

(平成7年11月9日受理)